

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12Q 1/60, 1/44, 1/26	A1	(11) 国際公開番号 WO97/00971 (43) 国際公開日 1997年1月9日 (09.01.97)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP96/01602</p> <p>(22) 国際出願日 1996年6月12日 (12.06.96)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平7/154959 1995年6月21日 (21.06.95) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 国際試薬株式会社 (INTERNATIONAL REAGENTS CORPORATION)[JP/J] 〒651 兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号 Hyogo, (JP)</p> <p>(72) 発明者: および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 池田昌郁 (IKEDA, Masafumi)[JP/J] 田畑光正 (TABATA, Hiromasa)[JP/J] 角山 功 (KAKUYAMA, Tsutomu)[JP/J] 橋口陽一 (HASHIGUCHI, Yoichi)[JP/J] 〒651-22 兵庫県神戸市西区室谷1丁目1番2号 国際試薬株式会社 研究開発センター内 Hyogo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime) 〒541 大阪府大阪市中央区平野町三丁目3番9号 (湯木ビル) Osaka, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: METHOD FOR ASSAYING CHOLESTEROL IN HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN FRACTION AND ASSAY REAGENT KIT</p> <p>(54) 発明の名称 高比重リポ蛋白分画中のコレステロールの定量方法及び定量用試薬キット</p> <p>(57) Abstract A method for assaying cholesterol in a high-density lipoprotein (HDL) fraction which comprises the following steps. By using an acylpolyoxyethylene sorbitan ester, cholesterol in the fractions of lipoproteins in a sample other than HDL is preferentially treated with enzymes such as cholesterol esterase and cholesterol oxidase to thereby form hydrogen peroxide. In the presence of peroxidases, colorless complexes are formed to thereby eliminate the hydrogen peroxide from the reaction system. Next, the actions of these enzymes on the cholesterol remaining in the fractions of lipoproteins other than HDL are suppressed by alkyl polyoxyethylene ethers. At the same time, the cholesterol contained in the HDL fraction is treated by these enzymes to thereby form hydrogen peroxide. The quinone coloring matter formed by the hydrogen peroxide is measured by the colorimetry to thereby determine the cholesterol content of the HDL fraction. By using this simplified method, a number of samples can be processed in a short time and even samples in a very small amount can be continuously assayed with an automatic analyzer. Thus it contributes to the improvement in the efficiency of routine work in clinical examinations.</p>		

(57) 要約

次の工程からなる高比重リポ蛋白 (HDL) 分画中のコレステロールの定量方法。

アシルポリオキシエチレンソルビタンエステルにより、試料中のHDL以外のリポ蛋白分画中のコレステロールにコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼなどの酵素を優先的に作用させて、過酸化水素を生成させる。ペルオキシダーゼの存在下で無色の複合体を形成させて、過酸化水素を反応系外に導く。次に、アルキルポリオキシエチレンエーテルにより、HDL以外のリポ蛋白分画中の残存するコレステロールに対するこれら酵素の作用を抑制させるとともに、HDL分画中のコレステロールに酵素を作用させて、過酸化水素を生成させる。過酸化水素により生成されたキノン色素を比色測定して、HDL分画中のコレステロールを定量する。

操作が簡略化され、多数の試料を短時間で処理できる。微量の試料でも自動分析装置にて連続的に測定できる。臨床検査の日常業務における作業効率の向上に貢献できる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LS	レソト	SD	スーダン
BB	バルバドス	GB	イギリス	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SG	シンガポール
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MC	モナコ	SI	スロベニア
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MD	モルドヴァ共和国	SK	スロバキア
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MG	マダガスカル	SN	セネガル
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MK	マケドニア共和国	SZ	スワジランド
CA	カナダ	IL	イスラエル	ML	マリ	TD	チャド
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CG	コンゴ	IT	イタリア	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CH	スイス	JP	日本	MW	マラウイ	TR	トルコ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CM	カメルーン	KR	大韓民国	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CU	キューバ	KZ	カザフスタン	NO	ノルウェー	US	アメリカ合衆国
CZ	チェコ共和国			NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン
						VN	ベトナム

明細書

高比重リポ蛋白分画中のコレステロールの定量方法及び定量用試薬キット

技術分野

本発明は、高比重リポ蛋白（HDL）分画中のコレステロール（以下「HDLコレステロール」ともいう。）の定量方法及び定量用試薬キットに関し、とりわけ臨床検査の分野において、血清などの生体試料中のHDLコレステロールの定量方法、及びHDLコレステロール定量用試薬キットに関する。

背景技術

血液中のリポ蛋白はその比重により、カイロミクロン（比重 <1.006 ）、超低比重リポ蛋白（VLDL、比重 $1.006\sim1.019$ ）、低比重リポ蛋白（LDL、比重 $1.019\sim1.063$ ）、高比重リポ蛋白（HDL、比重 $1.063\sim1.21$ ）などに分類され、これらのリポ蛋白の代謝に影響を与える疾患についての研究が進められてきた。中でもHDLについては、その分画中の成分であるコレステロールが虚血性心疾患に密接に関係するとの1977年のFraminghamの報告以来、急速に研究が進んでいる。

従来、HDLコレステロールの定量は沈澱分画法、超遠心法、電気泳動法などにより分離されたHDL分画について、その成分であるコレステロールが公知の方法にて測定されている。臨床検査での測定では、沈澱分画法がよく行われている。これは沈澱剤を用いてHDL以外のリポ蛋白分画を沈澱させ、それを遠心分離してHDL分画を得る。このときの沈澱剤としては、ポリアニオンと2価のカチオンとの組み合わせが良く用いられる。このようなポリアニオンにはポリエチレングリコール、リンタンゲステン酸、デキストラン硫酸などがあり、また2価のカチオンとしてはMg、Mn、Ca、Li、Niなどが知られている。

次に、遠心分離により得られたHDL分画中のコレステロールを定量する公知の方法としては、酵素反応による測定が良く用いられる。なかでも、コレステロールエステラーゼ（CE）とコレステロールオキシダーゼ（CO）を用い、さらにペルオキシダーゼ（POD）と色原体とを組み合わせると可視部領域で吸光度を

測定する方法が良く知られている。

しかしながら、このような従来の沈澱剤を用いる方法で、HDL分画を分離するには、遠心分離の操作が必要となるため、臨床検査の日常業務で効率化のための自動分析装置を用いる場合には、直接利用できないという制約があった。そのためHDLコレステロールを他の検査項目とマルチチャンネル化して測定するには支障があった。

発明の開示

本発明は、上述の課題を解決し、HDLコレステロールを効率良く測定すること、とりわけ臨床検査において自動分析装置を用いて測定できる有用な方法及びそのための試薬キットを提供することを目的とする。

本発明者らは鋭意研究した結果、HDL以外のリポ蛋白分画中のコレステロールに酵素を優先的に作用させる界面活性剤と、HDL以外のリポ蛋白分画中のコレステロールに対する酵素による作用を抑制させる界面活性剤とを用いることにより、HDL分画中のコレステロールが測定できることを見い出した。そして、さらに研究を重ねた結果、上述の目的が達成されることを見い出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、アシルポリオキシエチレンソルビタンエステルにより、HDL以外のリポ蛋白分画中のコレステロールに酵素を優先的に作用させて得られる反応生成物を反応系外に導き、次にアルキルポリオキシエチレンエーテルにより、HDL以外のリポ蛋白分画中の残存するコレステロールに対する酵素による作用を抑制させるとともに、HDLコレステロールに酵素を作用させて反応を進行させることを特徴とするHDLコレステロールの定量方法に関するものである。

さらにまた、本発明はアシルポリオキシエチレンソルビタンエステル及び酵素を含む第1試薬と、アルキルポリオキシエチレンエーテルを含む第2試薬とからなることを特徴とするHDLコレステロール定量用試薬キットに関するものである。

発明の詳細な説明

本発明における、コレステロールに作用する酵素としては、コレステロールエステラーゼ（CE）、コレステロールオキシダーゼ（CO）などが例示される。リポ蛋白分画中には、コレステロールの他にコレステロールエステルも含まれているので、通常、コレステロールエステルを加水分解させてコレステロールに変換させるために、コレステロールエステラーゼ（CE）をコレステロールオキシダーゼ（CO）と共存させる。

本発明の試薬キットにおける第1試薬中の酵素は、例えばCEの場合には、1単位/m l～100単位/m l、好ましくは1単位/m l～50単位/m l、COの場合には、0.5単位/m l～100単位/m l、好ましくは1単位/m l～50単位/m lとなるように配合するが、試料の種類などに応じて適宜決定される。

HDL以外のリポ蛋白分画であるLDL、VLDL、カイロミクロンなどに含まれるコレステロールに対して、上記酵素を優先的に作用させるアシルポリオキシエチレンソルビタンエステルは、通常C₁₂ソルビタンE_xと略記される、親水性部分にポリオキシエチレンを持つ非イオン性界面活性剤であり、本発明の目的に適合するものであれば全て用いることができる。具体的な商品名としては、Tween 21（C₁₂ソルビタンE₄）、Tween 81（C₁₂ソルビタンE₅）、Tween 20（C₁₂ソルビタンE₂₀）、Tween 40（C₁₈ソルビタンE₂₀）、Tween 60（C₁₈ソルビタンE₂₀）、Tween 80（C_{18.1}ソルビタンE₂₀）、Emasol 4130（C₁₈ソルビタンE_x）、Tween 85（C_{17.1}ソルビタンE₂₀）などが例示される。

本発明の試薬キットにおける第1試薬中のアシルポリオキシエチレンソルビタンエステルは、通常、反応液中において0.001w/v%～0.1w/v%、好ましくは0.001w/v%～0.05w/v%となるように配合されるが、試料の種類などに応じて適宜決定される。

HDL以外のリポ蛋白分画中のコレステロールに対する上記酵素の作用を抑制

させるアルキルポリオキシエチレンエーテルは、通常C₁₂E_xと略記される、親水性部分にポリオキシエチレンを持つ非イオン性界面活性剤であり、本発明の目的に適合するものであれば全て用いることができる。具体的な商品名としては、Atlas G 2 1 2 7 (C₁₂E₈)、Brij 3 6 T (C₁₂E₁₀)、Nopalcal 6-L (C₁₂E₁₄)、Brij 3 5 (C₁₂E₂₃)、Emulogphene B C 7 2 0 (C₁₂E_{9.8})、Sterox A J 1 0 0 (C₁₃E_{9.5})、Brij 5 6 (C₁₈E₁₀)、Brij 5 8 (C₁₈E₂₀)、Brij 7 6 (C₁₈E₁₀)、Brij 9 6 (C_{18.1}E₁₀)、Brij 7 8 (C₁₈E₂₀)、Brij 9 8 (C_{18.1}E₂₃)などが例示される。

本発明の試薬キットにおける第2試薬中のアルキルポリオキシエチレンエーテルは、通常、反応液中において0.001w/v%~5w/v%、好ましくは0.05w/v%~2w/v%となり、また第1試薬中に配合されるアシルポリオキシエチレンソルビタンエステルよりも高濃度となるように配合されるが、試料の種類などに応じて適宜決定される。

本発明の定量方法では、まずコレステロールに作用する酵素と、上記アシルポリオキシエチレンソルビタンエステルと、試料とを混合させる。すると、アシルポリオキシエチレンソルビタンエステルの存在により、反応液中に含まれる酵素が、HDL以外のリポ蛋白分画中のコレステロールに優先的に作用する。

酵素がCEとCOとの組合せからなる場合には、酵素の作用によりコレステロールの反応生成物として過酸化水素が生成する。本発明の定量方法においては、第2試薬中のアルキルポリオキシエチレンエーテルを反応系に混在させる前に、生成した反応生成物を反応系外に導く必要があり、例えば色原体が用いられる。色原体は、ニトロ基、アゾ基、カルボニル基、エチレン結合、シアン基などの発色団を含み、水酸基、アミノ基などの助色団を含まない有機化合物である。本発明において用いられ得る色原体としては、単独では発色能力が弱い、上記助色団を含む有機化合物が共存することにより、発色能力が増強されるものが好ましい。反応生成物が過酸化水素である場合には、ペルオキシダーゼ(POD)の存在下で、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシア

ニリンナトリウム塩 (HDAOS)、N-エチルー (2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トリイジン (TOOS) などの色原体と過酸化水素とを反応させて、無色の複合体を形成させ、過酸化水素を反応系外に導くことができる。

通常、PODは、 $0.01 \text{ U/ml} \sim 10 \text{ U/ml}$ 、好ましくは $0.5 \text{ U/ml} \sim 5 \text{ U/ml}$ 、色原体の濃度は、 $0.001 \text{ w/v} \% \sim 1 \text{ w/v} \%$ 、好ましくは $0.01 \text{ w/v} \% \sim 0.5 \text{ w/v} \%$ とするが、試料の種類などに応じて適宜決定される。

次に、反応液中に、第2試薬中のアルキルポリオキシエチレンエーテルを混在させることによって、HDL以外のリポ蛋白分画中の残存するコレステロールに対して、酵素の作用が抑制されるとともに、酵素がHDLコレステロールに対して作用し、酵素の作用によりコレステロールの反応が進行する。

酵素がCEとCOとの組合せからなる場合には、この反応により過酸化水素が生成される。この過酸化水素は、PODの存在下で、例えば4-アミノアンチピリンなどの助色団を含む有機化合物 ($0.001 \text{ w/v} \% \sim 0.1 \text{ w/v} \%$ 、好ましくは $0.001 \text{ w/v} \% \sim 0.05 \text{ w/v} \%$) と、色原体とを縮合反応させ、キノン色素を生成させる。なお、色原体としては、上述のHDAOS、TOOSなどを挙げることができる。このキノン色素を比色測定することによって、HDLコレステロールが測定できる。比色測定は既知の方法により行うことができ、例えば自動分析装置を用いて行うことができる。

本発明方法における各反応、即ち第2試薬を反応系に混在させる前または混在させた後の各反応は、それぞれ通常、室温下で、1分間～10分間、好ましくは3分間～7分間行なわれるが、特にこの条件に限定されるものではない。

本発明のHDLコレステロール定量用試薬キットは、前述のアシルポリオキシエチレンソルビタンエステル及び酵素を含む第1試薬と、アルキルポリオキシエチレンエーテルを含む第2試薬とからなる。

第1試薬中の酵素には、例えばCE、COなどを挙げることができる。また第1試薬中には、酵素の他に、通常例えば、酵素POD、さらにHDAOS、TO

OSなどの色原体が配合され得るが、これらの色原体と反応してキノン色素を生成するもの、例えば4-アミノアンチピリンなどは配合されない。

これに対して、第2試薬中には、通常、色原体と反応してキノン色素を生成するもの、例えば4-アミノアンチピリンなどが配合される。

なお、本発明の試薬キットは、遅くともHDLコレステロールの定量測定時において、このように第1及び第2の二種類の試薬に分かれていれば良い。従って、一般に試薬キットとしての形態は、安定性などを考慮して三種類以上の試薬に分けておき、測定のため使用時において上記の第1及び第2の二種類の試薬に調製するようなものでも良い。

実施例

以下、本発明をより詳細に説明するため実施例を挙げるが、本発明はこれらに限定されるものではない。

〔実施例1〕

アシルポリオキシエチレンソルビタンエステルとして商品名がTween 85、またアルキルポリオキシエチレンエーテルとして商品名がBrij 98の界面活性剤をそれぞれ使用して、次の第1及び第2試薬を準備した。

〈第1試薬〉

10 mMのリン酸緩衝液 (pH 7.0)、0.12 mg/mlのHDAOS、0.6 単位/mlのPOD、10 単位/mlのCO、10 単位/mlのCE、0.01 w/v %のTween 85

〈第2試薬〉

10 mMのリン酸緩衝液 (pH 7.0)、0.15 mg/mlの4-アミノアンチピリン、1.5 w/v %のBrij 98

日立7170型自動分析装置を用いて、試料4 μ lに第1試薬250 μ lを加え、5分後に第2試薬50 μ lを加え、5分後に波長600 nm/700 nmで測定した。試料としてHDLコレステロール濃度が150 mg/dlの血清を10段階に希釈したものを用いたところ、表1に示すように、良好な直線性が得ら

れた。

表 1

希釈率	測定濃度 (mg/dl)
0	0
1 / 10	13.3
2 / 10	26.6
3 / 10	39.9
4 / 10	53.2
5 / 10	66.5
6 / 10	79.8
7 / 10	93.1
8 / 10	106.4
9 / 10	119.7
10 / 10	133.0

この実施例においては、第1試薬を添加した後に、遠心分離などの煩雑な操作を必要とせず、試料中に第2試薬を添加するだけで、試料中のHDLコレステロールの量に対応して生成されたキノン色素の比色測定が行なわれる。

〔実施例2〕

実施例1と同様の試薬を用いて、同様に日立7170型自動分析装置で20例のヒト血清を試料として測定し、標準液の測定からHDLコレステロール値を求めた。そして同じ試料について市販製品〔商品名：HDL-コレス(PG)、国際試薬社製〕を用いて測定した値と比較した。その結果、表2に示すように、良好な相関性が得られた。

表 2

試料No.	本発明の方法	従来の方法（市販製品）
1	57.3	55.8
2	55.6	58.6
3	28.5	21.0
4	75.4	74.4
5	55.1	50.8
6	69.0	65.5
7	67.0	61.5
8	37.3	33.2
9	43.8	40.1
10	77.8	78.4
11	65.6	56.7
12	83.5	82.0
13	54.4	52.1
14	49.4	47.5
15	57.9	55.5
16	48.3	44.0
17	56.1	55.1
18	52.9	49.7
19	60.3	52.9
20	127.4	124.5

単位：mg/dl

産業上の利用可能性

本発明のHDLコレステロールの定量方法によれば、従来、沈澱分画法において必要とされていた遠心分離の操作が不要となるので、操作が簡略化され、多数の試料を短時間で、かつ容易に処理できる。しかも2種類の試薬を用いる方法に応用できるので、汎用型の自動分析装置を用いた連続的な測定が可能となり、HDLコレステロールを他の検査項目とマルチチャンネル化して測定することができる。また、試料を取り扱う上で、試料に直接手を触れる機会が著しく減少するので、ウイルス感染の危険性も減少する。さらに、微量の試料に対しても測定可

能であるので、小児や老人など採血量に制限がある場合でも測定が可能となる。
従って、本発明方法は、臨床検査の分野において極めて有用であり、臨床検査の
日常業務における作業効率の向上に貢献することができる。

また、本発明のHDLコレステロール定量用試薬キットは、本発明方法を実施
するための試薬キットとしての効果を奏する。

請求の範囲

1. アシルポリオキシエチレンソルビタンエステルにより、高比重リボ蛋白以外のリボ蛋白分画中のコレステロールに酵素を優先的に作用させて得られる反応生成物を反応系外に導き、次にアルキルポリオキシエチレンエーテルにより、高比重リボ蛋白以外のリボ蛋白分画中の残存するコレステロールに対する酵素による作用を抑制させるとともに、高比重リボ蛋白分画中のコレステロールに酵素を作用させて反応を進行させることを特徴とする高比重リボ蛋白分画中のコレステロールの定量方法。
2. 酵素がコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼである請求項 1 記載の方法。
3. アシルポリオキシエチレンソルビタンエステル及び酵素を含む第 1 試薬と、アルキルポリオキシエチレンエーテルを含む第 2 試薬とからなることを特徴とする高比重リボ蛋白分画中のコレステロール定量用試薬キット。
4. 酵素がコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼである請求項 3 記載の試薬キット。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01602

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12Q1/60, 1/44, 1/26

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12Q1/60, 1/44, 1/26

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST File on Science and Technology

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Clinical test apparatus reagent, Vol. 18, No. 4, (1995), Keiko Miyamoto and two others "Study of the direct measurement of HDL cholesterol using PEG modifying enzyme/sulfuric cyclodextrin complex system", p. 613-620	1 - 4
A	Lipid biochemistry study, Vol. 37, (1995), Hiroyuki Sugiuchi and seven others "Basic study of the direct measurement of HDL-Cholesterol", p. 219-222	1 - 4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

July 15, 1996 (15. 07. 96)

Date of mailing of the international search report

July 30, 1996 (30. 07. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP96/01602

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12Q 1/60, 1/44, 1/26

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12Q 1/60, 1/44, 1/26

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

J I C S T 科学技術文献ファイル

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	臨床検査機器・試薬, 第18巻, 第4号, (1995), 宮本恵子ほか2名「PEG修飾酵素/硫酸シクロデキストリン複合系を用いたHDLコレステロールの直接測定法の検討」, p. 613-620	1-4
A	脂質生化学研究, 第37巻, (1995), 杉内博幸ほか7名「HDL-Cholesterol直接測定法の基礎的研究」, p. 219-222	1-4

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.07.96

国際調査報告の発送日

30.07.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伊藤 明

印

4B

6807

電話番号 03-3581-1101 内線 3448